

Streptococcus thermophilus SBT1277株の産生する 新規バンクテリオシン : thermophilin1277に関する研究

著者	冠木 敏秀
号	47
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	農第758号
URL	http://hdl.handle.net/10097/60121

かぶき としひで

氏 名（本 籍 地） 冠 木 敏 秀

学 位 の 種 類 博士（農学）

学 位 記 番 号 農第 758 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 23 年 3 月 3 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 2 項

論 文 題 目 *Streptococcus thermophilus* SBT1277 株の産生する新規バクテリオシン：
thermophilin1277 に関する研究

博士論文審査委員 （主査）教 授 齋 藤 忠 夫

教 授 駒 井 三千夫

教 授 池 田 郁 男

論文内容要旨

第一章 序論

有害微生物を制御する最も一般的な方法は加熱であるが、過度の加熱は食品の品質を大きく損なう。そこで、長年に渡り化学合成保存剤が使用されてきたが近年の食品に対する消費者の関心は急速に高まっており、特に自然志向や安全志向により敬遠される傾向にある。そこで、より安全な手段での微生物制御方法の確立が望まれている。そこで、人類が長期にわたり食品として食べてきた植物や動物あるいは微生物由来の抗菌物質を利用した保存方法が注目を集めている。

乳酸菌は、一般に乳酸などの有機酸をはじめとする低分子抗菌物質を生産するが、それ以外にタンパク質性の抗菌物質であるバクテリオシンを産生するものも存在する。*Streptococcus (S.) thermophilus* は、長期にわたりチーズや発酵乳の製造に用いられており、産業上非常に重要な菌種である。これまでに、雪印乳業株式会社の研究所で原料乳より単離された *S. thermophilus* SBT1277 株がバクテリオシンを産生しており、比較的抗菌スペクトルの広いことが明らかとなっている。

以上の背景をもとに本研究では、バイオプリザバティブとしてバクテリオシンを産生する *S. thermophilus* SBT1277 株を用いた微生物制御を行うことで安全な食品の創出を目指して、その開発基盤となる基礎的知見を得ることを試みた。そのために、本バクテリオシンの化学的および分子生物学的な特徴づけを正確に行うこと、および本菌のチーズスターターとしての応用の可能性を明らかにすることを研究の目的とした。

第二章：*S. thermophilus* SBT1277 株の産生するバクテリオシンの諸性質の特徴付け

S. thermophilus SBT1277 株のバクテリオシンが新奇なバクテリオシンであるか評価するために、抗菌スペクトルや化学的安定性、培地や培養条件によるバクテリオシン産生能への影響などを測定し、既報告のバクテリオシンの諸性質と比較することを目的とした。

抗菌スペクトルは、類縁菌である *S. thermophilus* のみならず、*Clostridium* や *Microbacterium* など乳汚染菌に対しても抗菌活性を示した (Table 1)。本バクテリオシンは、加熱処理や pH3-10 の条件下でも活性の低下は見られなかった。一方、タンパク質分解酵素に対しては高い感受性を示した (Table 2)。これらの結果から、本バクテリオシンは高い耐熱性や広い pH 安定性を有しており、産業上利用する上で極めて有用な性質であると考えられた。

さらに本バクテリオシン産生条件を検討した結果、培地 pH の影響が大きいことが判明した。すなわち、培地 pH が 6.0-6.5 では活発なバクテリオシン産生が見られたが、pH5.5 以下での外部環境ではバクテリオシン産生能は低下した (Table 3、Fig. 1)。

以上の結果と既知バクテリオシンの諸性質を比較した結果、本バクテリオシンはいずれのバクテリオシンとも異なる性質を有することから、新規なものであると推定し、*thermophilin 1277* と命名した。

第三章：一次アミノ酸配列と構造遺伝子のクローニング、遺伝子配列解析

これまでに多くのバクテリオシンの構造が明らかとなっており、その化学構造の特徴から 5 つのグループに分類されている。これらの分類体系では、同一グループのバクテリオシンでは、活性や作用メカニズムが類似している (Table 4)。アミノ酸配列 (一次構造) や二次構造の情報はバクテリオシンの性質を把握する上で有効であることから、*S. thermophilus* SBT1277 株の培養上清から本バクテリオシンを精製し、アミノ酸配列を決定することを目的とした。

培養上清より疎水クロマトグラフィーおよび逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) を組み合わせることで *thermophilin* 1277 を精製した (Table 5)。SDS-PAGE では単一バンドを示し、推定の分子量は 3,500Da であった (Fig. 2、Fig. 3)。精製物の質量を測定した結果、3428.67(m/z) であった (Fig. 4)。さらに N-末端配列分析を行ったところ、6 残基の未同定を含む 31 残基の配列が明らかとなった。相同性解析の結果、*S. bovis* HJ50 株の産生する *bovicin* HJ50 のアミノ酸配列と一致していた (Fig. 5)。

N-末端アミノ酸配列の情報を基にゲノム遺伝子から、バクテリオシン構造遺伝子 (*tepA*) を含む 1.1kbp をクローニングした。その結果 (Table 6, Fig. 6)、典型的な dual function ABC transporter の認識部位である GG/GA モチーフを含む 25 残基のリーダーペプチドを含む 58 残基のアミノ酸から構成されていることが示唆された。遺伝子配列から推定されるペプチド配列は Class I、サブクラス A2 タイプのランチビオティックスと高い相同性を示した (Fig. 7)。

ランチビオティックスには、異常アミノ酸が含まれていることから、ペプチドシーケンスにより同定できなかったアミノ酸について同定することを試みた。その結果、Cys21 と Cys29 は、ジスルフィド結合をしていることが示唆された。また、Thr8、Thr10 は、Cys13、Cys32 のいずれかの組み合わせでチオエチル結合し、3-メチルランチオニンを形成していると考えられた (Fig. 8)。分子内の架橋構造の抗菌活性への寄与を測定した結果、いずれの結合も切断することで抗菌活性が消失したことから、各々の結合は活性に必須であると考えられた (Table 7)。また、一次アミノ酸配列が同一である *bovicin* HJ50 は、文献的に分子内ジスルフィド結合を切断することによる失活が認められなかったことから、分子内架橋構造が *thermophilin* 1277 とは異なると推定された。

以上の結果より、*thermophilin* 1277 は新規なランチビオティクであり、*S. thermophilus* 菌株から見出されたバクテリオシンでは初めてのランチビオティクであると考えられた。

第四章：バクテリオシンオペロンのクローニングおよび発現解析

ランチビオティックスの生成には、構造遺伝子以外に修飾、分泌、自己免疫などに関わるタンパク質が必須である。そこで、*thermophilin* 1277 の生合成や自己免疫機構を明ら

かにするためにオペロン構造を明らかにすることを目的とした。

染色体 DNA 各種 PCR 法を用いて構造遺伝子(*tepA*)を含む 16kbp の遺伝子配列を決定した結果、20 個の Open Reading Frame (ORF)が検出され、9 つの ORF がバクテリオシン関連タンパク質と高い相同性、類似性を示した(Fig. 9, Table 8)。相同性解析の結果、推定の構造遺伝子 *tepA* の下流に修飾酵素 *tepM*、ABC タイプ膜輸送タンパク質 *tepT*、3 成分性の免疫タンパク質 *tepFEG*、さらに 2 成分の制御系である *tepKR* の遺伝子が存在した。その下流に機能未知のペプチドが見出され、相同性の高いものは見られなかったが、2 回膜貫通タイプのペプチドであり、ランチビオチックスで報告のある LanI 様の免疫ペプチド (*tepl*) である可能性が示唆された(Fig. 10)。そこで、本ペプチドの機能を確認するために PCR により *tepl* 領域を増幅後、pIL253-P32 にライゲーション後(pILTEPI)、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 にトランスフォームし、thermophilin 1277 に対する耐性を親株と比較した(Fig. 11)。その結果、*tepl* の発現株は野生株と比較して 1.4 倍耐性が増加した(Fig. 12)。以上の結果から *tepl* 遺伝子は、thermophilin 1277 の免疫に関わるペプチド産生遺伝子であると推定できた(Fig. 13)。

第五章：チーズスターターとしての応用

本バクテリオシンは、チーズ保存中のガス産生の原因菌である *Clostridia* に対して抗菌活性を有する。そこで、フレッシュチーズスターターに *S. thermophilus* SBT1277 株を用いたときの保存中の膨張抑制効果を試験した。また、酪酸菌に殺菌的に作用するリゾチームとの相乗効果についても試験を行った。10℃での保存試験を行った結果、経時的に膨張が見られ、各水準の膨張発生率を Kaplan-Meier 法による Logrank 検定を行った。その結果、バクテリオシン産生菌使用チーズの保存性は、バクテリオシン非産生乳酸菌の試作品と比較して有意に高かった。また、リゾチームと併用した場合、バクテリオシン産生乳酸菌のみより保存性は向上していた(Fig. 14)。

チーズスターターとしてバクテリオシン産生スターターを用いることで、スターター乳酸菌の死滅を促進することで、熟成を促進させる可能性が報告されている。そこで、セミハードチーズ中での本菌による熟成促進効果について検証した。

スターターとしてこれまでにタンパク質分解活性の高いことが明らかとなっており、thermophilin 1277 に感受性の *Lactobacillus*(*L.*) *helveticus* SBT2171 株単独および *L. helveticus* SBT2171 株に加えバクテリオシン産生 *S. thermophilus* SBT1277 株を添加した半硬質チーズを試作し、10℃での熟成試験を行った。

その結果、対照の *L. helveticus* SBT2171 株のみで製造したチーズと比較して、*L. helveticus* SBT2171 株 + *S. thermophilus* SBT1277 株で製造したチーズのほうが遊離アミノ酸量は、1.7 倍増加していた(Fig. 15、16)。よって、バクテリオシン産生 *S. thermophilus* SBT1277 株を熟成型チーズスターターとして用いることで、熟成促進効果が期待できることが明ら

かとなった。

第六章：総括

- 1) *S. thermophilus* SBT1277 から単離したバクテリオシン、thermophilin 1277 はランチビオチクであり、*S. thermophilus* 菌株からは初めてのランチビオチクの分離であった。
- 2) thermophilin1277 は、類縁である *S. bovis* HJ50 のバクテリオシン bovicin HJ50 と一次アミノ酸のレベルでは同一であったが、分子内架橋構造や修飾タンパク質に相違が見られたことから、高次構造は異なると考えられた。
- 3) 本バクテリオシンの構造遺伝子を含む 16kbp の遺伝子配列を決定したところ、少なくとも 9 個の遺伝子がバクテリオシン生合成に関与していることが示唆された。
- 4) 相同性が見られないバクテリオシン関連遺伝子と考えられた *tepI* を異種発現させたところ、本遺伝子は、本バクテリオシンの免疫ペプチドであることが明らかとなった。
- 5) 本菌をスターターとしてフレッシュチーズ中で酪酸菌によるガス膨張の抑制が確認できた。
- 6) セミハードチーズ製造時に用いるスターターとして本菌を用いたところ、熟成中の遊離アミノ酸産生量は増加し、熟成が促進されることが確認できた。

本研究により、*S. thermophilus* SBT1277 株の産生するバクテリオシン、thermophilin 1277 が新規なランチビオチクであることを明らかにすることができた。さらに応用としてチーズ保存中の酪酸菌によるガス膨張の抑制やバクテリオシン感受性細菌との組み合わせスターターを用いることで、チーズ熟成促進効果が確認できた。今後、バイオプリザバティブとしての製品開発へ繋がることが期待される。

**Table 1: Indicator strains and their antimicrobial activities
by thermophilin 1277**

Indicator strain ¹⁾	Medium ²⁾	Temperature (°C)	Activity ³⁾ (AU ml ⁻¹)
<i>S. thermophilus</i> SBT1277	M17	37	0
<i>S. thermophilus</i> SBT10137	M17	37	6,400
<i>S. thermophilus</i> SBT10814	M17	37	12,800
<i>S. thermophilus</i> ATCC19258 ^T	M17	37	800
<i>S. thermophilus</i> SBT10813	M17	37	12,800
<i>S. thermophilus</i> SBT10838	M17	37	3,200
<i>S. thermophilus</i> SBT10914	M17	37	12,800
<i>L. acidophilus</i> JCM1132 ^T	MRS	37	400
<i>L. gasseri</i> SBT2055	MRS	37	0
<i>L. gasseri</i> JCM1131 ^T	MRS	37	0
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> SBT0164	MRS	37	3,200
<i>L. helveticus</i> SBT10511	MRS	37	12,800
<i>L. helveticus</i> SBT2171	MRS	37	12,800
<i>L. helveticus</i> SBT1270	MRS	37	12,800
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC11454	M17	30	800
<i>Microbacterium lacticum</i> SBT3513	BHI	30	1,600
<i>Microbacterium lacticum</i> SBT3514	BHI	30	1,600
<i>Enterococcus faecalis</i> SBT3515	BHI	30	100
<i>Clostridium butyricum</i> SBT3516	BHI	30	1,600
<i>Clostridium sporogenes</i> IFH 493	BHI	30	1,600
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> SBT3517	BHI	30	800
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	BHI	30	0
<i>Bacillus cereus</i> IFO13494	BHI	30	50
<i>Listeria innocua</i> IFH180	BHI	30	0
<i>Listeria innocua</i> IFH178	BHI	30	0
<i>Listeria monocytogenes</i> IFH181	BHI	30	0
<i>Listeria monocytogenes</i> IFH182	BHI	30	0
<i>Listeria monocytogenes</i> IFH179	BHI	30	0

1) ATCC: American Type Culture Collection, SBT: Snow Brand Culture Collection, IFH: Institute of Food Hygiene, IFO: Institute for Fermentation, Osaka.

2) M17 (BD), MRS (BD), BHI: Brain Heart Infusion broth (BD)

3) Antibacterial activity was determined by using various bacteria after serial dilutions of crude bacteriocin by the agar well diffusion method.

**Table 2: Sensitivity of the bacteriocin
to enzymes, pH and heat treatment**

	treatment	Activity (AU ml ⁻¹)
Enzyme	Control	320
	Trypsin	80
	Proteinase K	0
Heat	50°C for 30 min	320
	70°C for 30 min	320
	100°C for 30 min	320
	121°C for 15 min	320
	121°C for 30 min	320
	121°C for 60 min	320
	130°C for 60 min	320
pH	pH 3 to 10 for 1 hour	320

**Table 3: Final pH, viable cell count and bacteriocin activity in various
broths after 16 hours of incubation of *S. thermophilus* SBT1277**

Medium	Viable cell counts (CFU ml ⁻¹)	pH	Bacteriocin activity (AU ml ⁻¹)
M17-Lactose	8.1×10^8	5.93	320
M17-Glucose	1.6×10^9	5.90	320
SYL	3.6×10^8	5.20	0
MRS	4.1×10^8	4.79	0
ST	3.0×10^9	4.20	0

Table 4: Classification of bacteriocins produced by lactic acid bacteria

Class	Character
Class I	Lantibiotic : small peptide (<5kDa) containing unusual amino acid
	Type A: Linear structure
	Type AI: Elongated and flexible
	Type AII: An unbridged N-terminal extremity and a globular C-terminal part
	Type AIII: Two-component lantibiotics
Class II	Type B: Globular structure
	Small (<5kDa) heat-stable peptide containing non unusual amino acid
	Class IIa: Anti-Listeria peptide with N-terminal consensus sequence YGNGV
	Class IIb: Two-component bacteriocin
	Class IIc: <i>sec</i> -dependent secreted bacteriocin
Class III	Class IId: other
	Large (>30kDa) heat labile protein
	Class IV
	Complex bacteriocin
	Class V
	Circular bacteriocin

Table 5: Purification of thermophilin 1277 from culture

	Volume (ml)	Total activity (AU)	Total Protein (mg)	Activity Recovered (%)	Specific Activity (AU/mg)	Purification (fold)
Culture supernatant	100	64,000	53.3	100	1,201	1.00
Hydrophobic chromatography by OASIS-HLB(Waters)	22.5	57,600	11.25	90.0	5,120	4.26
Re-Hydrophobic chromatography by OASIS-HLB(Waters)	30.375	19,440	3.508	30.4	5,542	4.62
C18-HPLC	4.55	2,730	0.2	4.3	13,650	11.4

Table 6: The primers used for PCR amplification

Primer	Sequence(5'→3')	Reference
tep1f	atgatgaatgctactgaaaacaaat	Xiao <i>et al.</i> 2004
tep2f	tggtgcagatcgtggatgg	Xiao <i>et al.</i> 2004
tep1r	cctgcacaaattgaagaattacattgg	This study
tep2r	ttctaattcttggtcactcacagtctc	This study

Table 7: Effect of the ring structure on the antimicrobial activity of thermophilin 1277

	Unmodified	Cleaved disulfide bridge	Cleaved thioether bridge
Thermophilin 1277	Active	Inactive	Inactive
Bovicin HJ 50 *	Active	Active	N.D.**

* Xiao *et al.*, 2004, ** N.D.: not determined

Table 8. Deduced peptides and proteins derived from *tep*

ORF	Length (amino acids)	Proposed function	Best homolog [identities (%), no. of amino acids], GeneBank accession no.	Localization (TMS no) ^a	pI	Molecular weight (kDa)
<i>ORF1</i>	347	Unknown	helicase, <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (95%, 2281aa), YP002745281	Soluble (0)	5.30	41.0
<i>ORF2</i>	99	Unknown	conserved domain protein, <i>S. suis</i> 89/1591 (88%, 99aa), ZP03624205	Soluble (0)	4.15	12.0
<i>ORF3</i>	96	Unknown	membrane protein, <i>S. equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (73%, 89aa), YP002745279	Membrane (3)	6.07	10.9
<i>tepA</i>	58	pre thermophilin 1277	bovicin HJ50, <i>S. bovis</i> HJ50 (100%, 58aa), AAP23217	Soluble (0)	4.44	6.1
<i>tepM</i>	837	Post translational modification	BovM, <i>S. bovis</i> HJ50 (99%, 837aa), ACA51935	Soluble (0)	5.71	97.6
<i>tepT</i>	680	Processing and secretion ABC transporter.	BovT, <i>S. bovis</i> HJ50 (99%, 311aa), ACA51936, BovE, <i>S. bovis</i> HJ50 (98%, 292aa), ACA51937	Membrane (6)	8.38	77.3
<i>tepF</i>	302	Subunit of ABC transporter involved in immunity. ATP binding protein	lantibiotic transport ATP-binding protein, <i>S. suis</i> SC84 (63%, 304aa), YP003024866	Soluble (0)	5.70	33.8
<i>tepE</i>	240	Subunit of ABC transporter involved in immunity. ATP transporter	unknown, <i>S. bovis</i> HJ50 (98%, 240aa), ACA51938	Membrane (7)	9.30	27.4
<i>tepG</i>	238	Subunit of ABC transporter involved in immunity. ATP transporter	unknown, <i>S. bovis</i> HJ50 (98%, 238aa), ACA51939	Membrane (6)	9.11	27.3
<i>tepK</i>	503	Histidine kinase	BovK, <i>S. bovis</i> HJ50 (99%, 503aa), ACA51940	Membrane (8)	8.06	58.1
<i>tepR</i>	208	Response regulator	BovR, <i>S. bovis</i> HJ50 (98%, 198aa), ACA51941	Soluble (0)	4.99	24.1
<i>tepI</i>	52	immunity protein	Not hit	Membrane (2)	10.02	6.0
<i>ORF4</i>	161	Unknown	Sdb1, <i>S. bovis</i> HJ50 (100%, 161aa), ACA51942	Membrane (1)	5.27	18.0
<i>ORF5</i>	216	Unknown	unknown. <i>S. bovis</i> HJ50 (99%, 216aa), ACA51943	Membrane (1)	5.44	24.4
<i>ORF6</i>	362	Unknown	DNA primase. <i>S. suis</i> BM407 (78%, 358aa), NP735785	Soluble (0)	5.97	41.7

^aTMS, transmembrane segment number, Deduced using the SOSUI program.

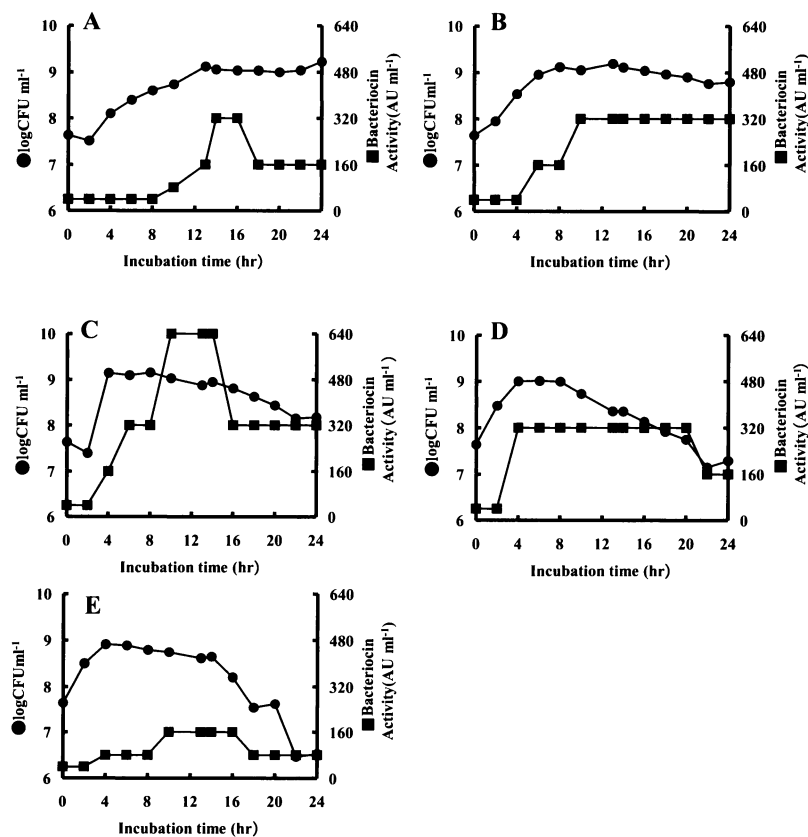


Fig. 1: Growth of *Streptococcus thermophilus* SBT1277 (●) and bacteriocin production (■) in M17 broth at 25 ° C (A), 30 ° C (B), 35 ° C (C), 40 ° C (D), and 45 ° C (E).

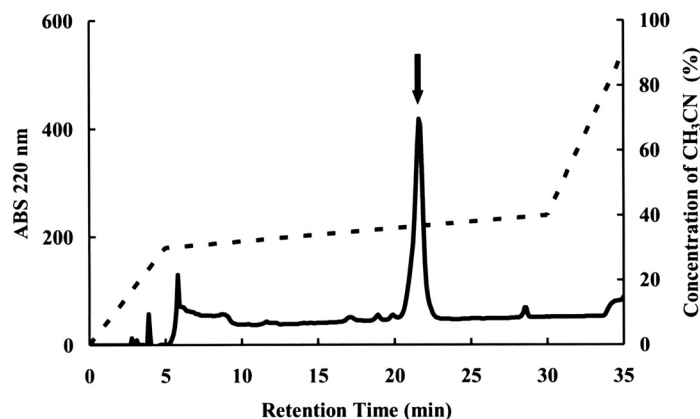


Fig. 2: C18 reverse-phase HPLC elution profile of purified thermophilin 1277. The bold line show elution pattern. Dotted line show the concentration of acetonitrile.

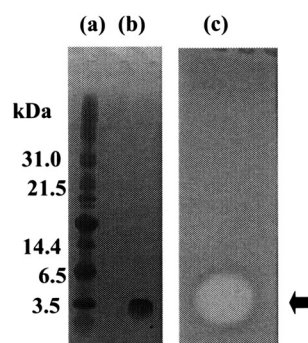


Fig. 3: Tricine-SDS-PAGE and *in situ* assay of purified thermophilin 1277. Lane A, molecular weight markers; Lanes B and C, purified thermophilin 1277. Lanes A and B were stained with Coomassie brilliant blue. Lane C shows the results of an *in situ* assay used to detect bacteriocin activity. The arrow indicates the band of bacteriocin.

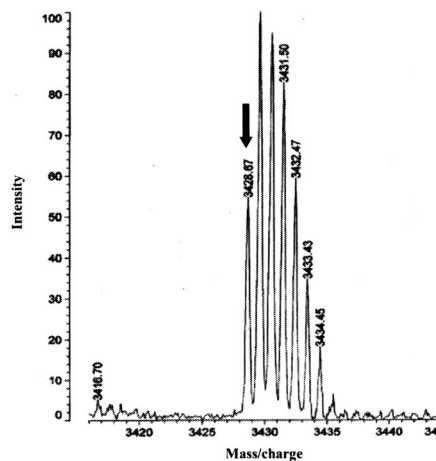


Fig. 4: MALDI-TOF mass spectrum of thermophilin 1277.

1 5 10 15 20 25 30

A: A D R G W I K X L X K D X P N I I S S I X A G T I I T A X K N

B: A D R G W I K T L T K D C P N I I S S I C A G T I I T A C K N C A

Fig. 5: Amino acid sequences of Thermophilin 1277 from *S. thermophilus* SBT1277 (A) and of bovicin HJ50 from *S. bovis* HJ50 (B). X indicates no identified residues by Edman degradation. Thr⁸ and Thr¹⁰ of bovicin HJ50 may be involved in the formation of 3-methylanthionine with two cysteine residues. Abu, 1- α -aminobutyric acid.

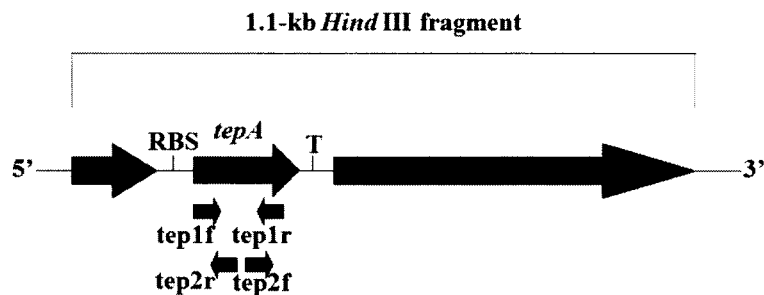


Fig.6. Graphic illustration of the thermophilin 1277 locus showing potential open reading frames (indicated by long arrows) and the primer locus for cloning (indicated by short arrows).

RSB: a putative ribosomal binding site. T: a putative transcriptional terminator.

	Leader peptide	Processing site	Propeptide
		↓	
thermophilin 1277	-----MMNAT-ENQIFVETVSDQLEMLIGG	AD--RGWIKTLTKDCPNVISSICAGTIITACKNCA	
bovicin HJ 50	-----MMNAT-ENQIFVETVSDQLEMLIGG	AD--RGWIKTLTKDCPNVISSICAGTIITACKNCA	
streptococcin A-M49	-----MTKEH-EIINSIQEVSLEELDQIIGA	GK--NGVFKTISHECH-----LNTWAFIATC--CS	
streptococcin A-F22	-----MEKNN-EVINSIQEVSLEELDQIIGA	GK--NGVFKTISHECH-----LNTWAFIATC--CS	
mutacin II	-----MNKLNSNAVVSLENSDSELDLILGG	NRWWQGVVPTVSYECR-----MNSWQHVFTC--C-	
bacteriocin J46	-----MKEQ--NSFNLLQEVTESELDLILGA	KGG-SGVIHTISHEVI-----YNSWNFVFTC--CS	
nukacin ISK-1	MENSKVMKDI--EVANLLEEVQDELDNEVLGA	KKK-SGVIPTVSHDCH-----MNSFQFVFTC--CS	
salivaricin A	-----MKNSKDIILNNAIEVSEKELMEVAGG	KRG-SGWIATITDDCP-----NSVFVC--C-	
lacticin 481	-----MKEQ--NSFNLLQEVTESELDLILGA	KGG-SGVIHTISHECN-----MNSWQFVFTC--CS	
Consensus	V EL G	G T C C C	

Fig.7: Multiple sequence alignment of thermophilin 1277 with homologous type AII lantibiotics. The arrow indicates the probable cleavage site.

Accession number: thermophilin 1277 (AB23046), bovicin HJ50 (AY271354), streptococcin A-M49 (AAA62362), streptococcin A-F22 (AAB92600), mutacin II (AAC38144), bacteriocin J46 (CAA61674), nukacin ISK-1 (BAD01007), salivaricin A (P36500), lacticin 481 (AAC72257).

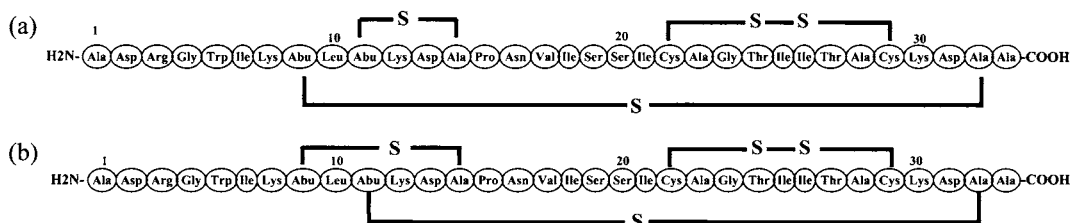


Fig 8: Two possible bridging structures of thermophilin 1277 (a) and (b). Thioether bridges are indicated by “-S-” and disulfide bridges are indicated “-S-S-”. Abu-S-Ala, 3-methylanthionine; Abu, 2-aminobutanoic acid

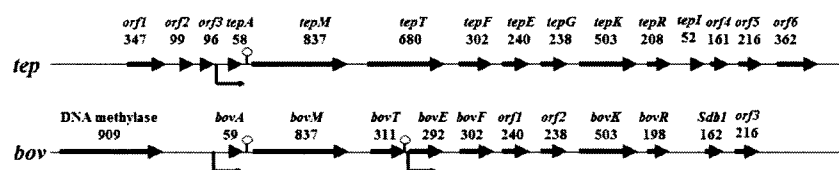


Fig. 9. Comparison of the gene clusters for thermophilin 1277 and bovicin HJ50. The names of genes and a protein are shown with the amino acid length. Predicted promoters and a terminator are represented by angled arrows and an omega-like symbol, respectively.

TepI (52aa)	<u>MKKYIPLICFLLFIVFLGITVRAFLADKTLMVADGLLSIVFFISELITRKKL</u> (4-25, 22) (27-48, 22)
Ecil (62aa)	<u>MNIYLKIVITALFFSSIIFTVTYVSSKNLGMSLLFGLLSFIANLVYDYVMGASERKSKKD</u> NK (3-25, 23) (27-49, 23)
PepI (69aa)	<u>MNIYLVILTSLSFFALIIFFIVTYITTKQWGTSLGFSSLSFIGNFIYDYSTKLSDKKYEKR</u> INSNKKDKL (3-25, 23) (29-51, 23)
LtnI (116aa)	<u>MKNENINTFSLSFYSLKEWAEGSANNYNILLGLSFIIVMSSVFFVTISTKIGKKDERT</u> <u>TKISLSAYSACVLITLIICDIIFPKGYLIQFFFLKYGFSCLVGGIYCLLKYIKDNK</u> (64-86, 23) (90-112, 23)
NukH (96aa)	<u>MKRKDYLEFFVIALLEPLISLLQLMKISLIHNYQSFFSIVNIICILFTIAYSILVINSKK</u> <u>KNNLQKTILILSIIYILTLIFISFGVIINMFN</u> (7-29, 23) (66-88, 23) (35-56, 22)

Fig 10. Primary sequences for (putative) immunity peptides of LAB bacteriocins. TepI, Ecil, PepI, LtnI, and NukH are immunity peptides for thermophilin 1277, epicidin 280, Pep5, lacticin 3147 and nukcin ISK-I, respectively. The transmembrane regions deduced using SOSUI program are underlined. The residue positions and lengths of the region are shown within parentheses.

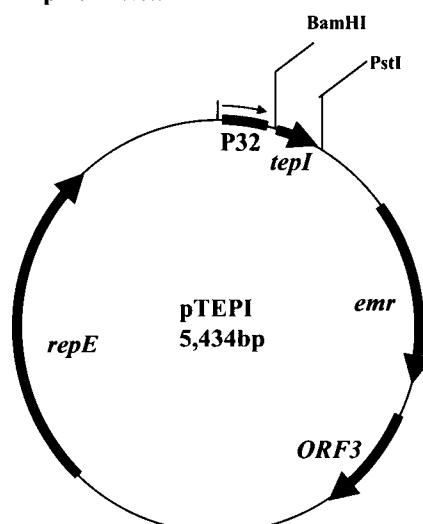


Fig.11. Plasmid map of the *tepI* expression vector pTEPI. P32, the lactococcal constitutive promoter; *tepI*, the putative thermophilin 1277 immunity gene; *emr*, the erythromycin resistance gene; *ORF3*, an uncharacterized ORF in the vector pIL253; and *repE*, the replication protein E gene.

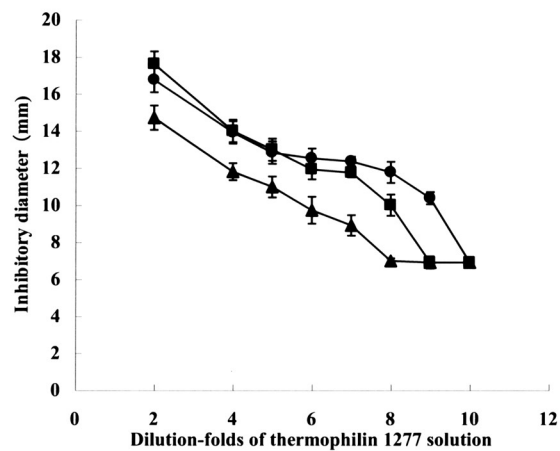


Fig 12. Immunity assay for the recombinants of *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 against thermophilin 1277. The immunity levels of *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (●), MG1363 (pIL253-P32) (■), and MG1363 (pTEPI) (▲) were investigated by agar well diffusion assay using serially diluted culture supernatants of *S. thermophilus* SBT1277 (thermophilin 1277 solution).

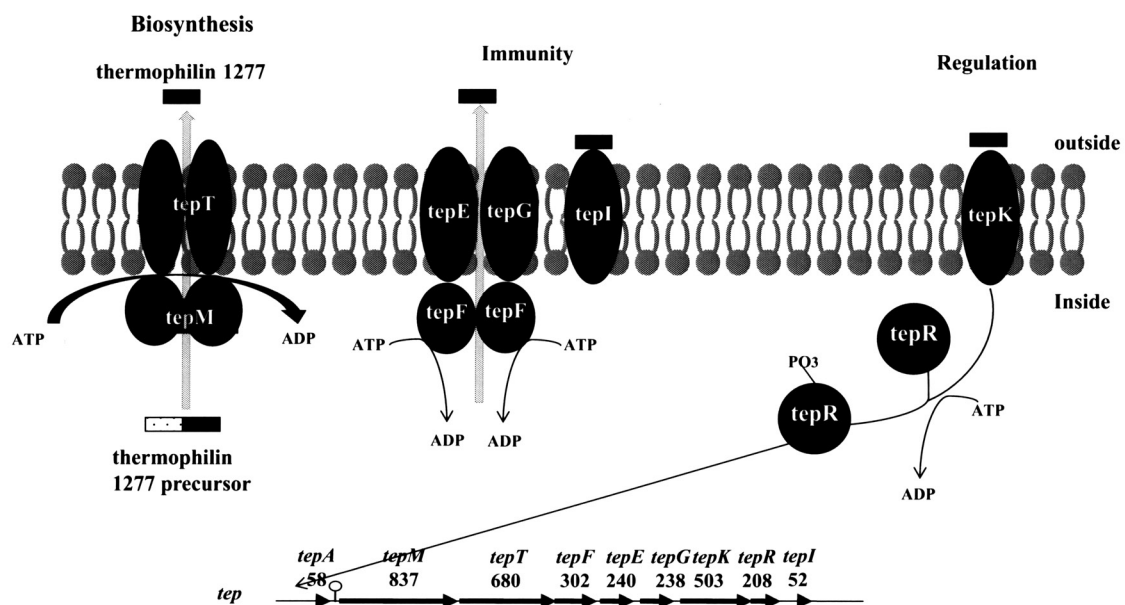


Fig:13 A schematic showing putative thermophilin 1277 production

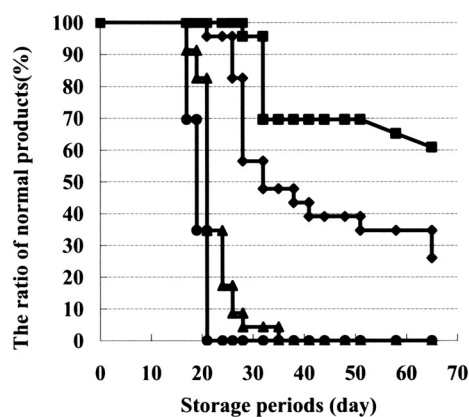


Fig. 14: Effect of the late blowing inhibition for *S. thermophilus* strain in the model fresh cheeses. Model fresh cheeses were manufactured with *S. thermophilus* SBT1277 (Bac+)(▲), *S. thermophilus* ST121 (Bac-)(●), *S. thermophilus* SBT1277+lysozyme(■), *S. thermophilus* ST121+lysozyme(◆).

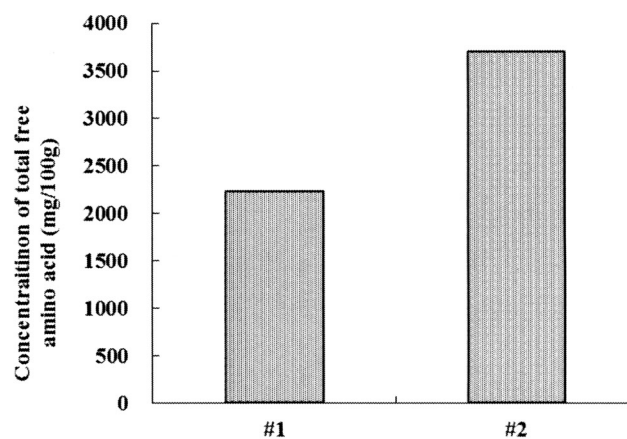


Fig. 15: Concentration of free amino acid in the semi-hard cheese at 6 month ripening at 10°C. Cheeses were manufactured with *Lactobacillus helveticus* SBT2171(#1), *Lactobacillus helveticus* SBT2171+ *S. thermophilus* SBT1277(Bac+)(#2).

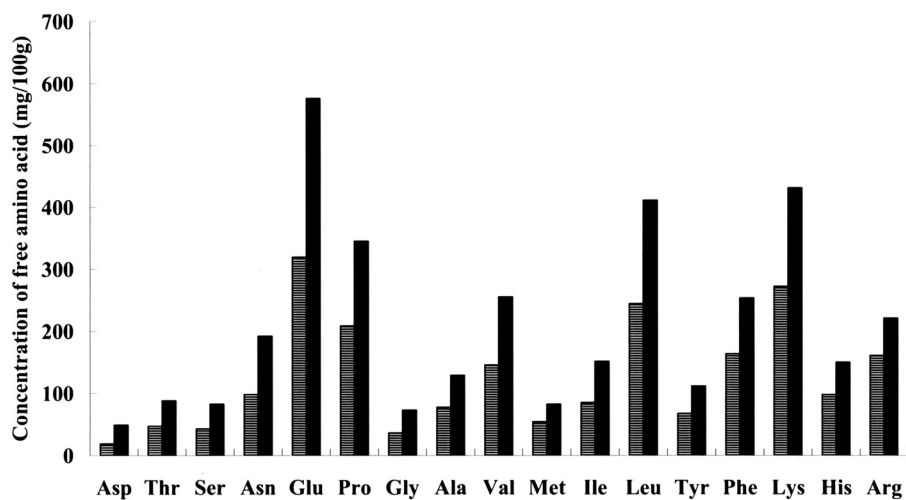


Fig. 16: Concentration of amino acid in the semi-hard cheese at 6 month ripening at 10°C. Cheeses were manufactured with *Lactobacillus helveticus* SBT2171(□), *Lactobacillus helveticus* SBT2171+ *S. thermophilus* SBT1277(Bac+)(■).

論文審査結果要旨

本研究は、乳より単離された *Streptococcus thermophilus* 1277 が生産する抗菌性ペプチド（バクテリオシン）の特性解析とチーズ産業へ応用した安全な食品創出を目指し、開発基盤的知見を得ることを試みた。

1277 株の生産するバクテリオシンは、抗菌スペクトルは広く、*Clostridium* 等の乳汚染菌に対しても抗菌活性を示した。加熱処理や pH3-10 の条件下でも安定であったが、タンパク質分解酵素に対しては高い感受性を示した。培地 pH が 6.0-6.5 では活発な産生が見られたが、pH5.5 以下では産生能は低下した。本バクテリオシンは新規物質と考え、**thermophilin 1277** と命名した。

次いで、一次アミノ酸配列と構造遺伝子のクローニングを行い、その構造遺伝子の配列解析を行った。精製バクテリオシンは、SDS-PAGE で 3500Da であり、N-末端配列分析では、*S. bovis* HJ50 株の産生する bovicin HJ50 のアミノ酸配列と一致した。遺伝子配列から推定されるペプチド配列は Class I、サブクラス A2 タイプのランチビオティクスと高い相同性を示した。SS 結合およびチオエステル結合の切断後の活性の違いより、bovicin とは異なる *S. thermophilus* からの初めてのランチビオティクと推定された。

次いで、thermophilin 1277 の生合成や自己免疫機構の解明のためにオペロン構造を明らかにした。構造遺伝子(*tepA*)を含む 20 個の ORF が検出され、9 個の ORF がバクテリオシン関連タンパク質と高い相同性、類似性を示した。発現実験の結果、*tepI* 遺伝子は免疫に関わるペプチド産生遺伝子であった。

最後に、本 thermophilin 1277 のチーズスターターとしての応用研究を実施した。対照の *L. helveticus* SBT2171 株のみで製造したチーズと比較して、*L. helveticus* SBT2171 株 + *S. thermophilus* SBT1277 株で製造したチーズの方が遊離アミノ酸量は 1.8 倍に増加し、酪酸菌によるガス膨張も抑えられた。よって、バクテリオシン産生 *S. thermophilus* SBT1277 株を熟成型チーズスターターとして用いることで、ガス産生の無い熟成促進効果が期待できた。

以上の研究結果から、審査員一同は、本研究により *S. thermophilus* より初めてのランチビオティクスとしての thermophilin 1277 を発見し、その化学構造および遺伝子オペロンを明らかにし、チーズスターターとしての高い可能性についても解明した業績は大きいと判断し、本研究者に博士（農学）の学位を付与するに値すると判定した。